

Aus der I. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

DIE BESTIMMUNG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL VON KNOCHENMARKASPIRATEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dieter Claus
aus Pirna

1968

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der I. Inneren Abteilung des
Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus H o l l d a c k

DIE BESTIMMUNG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL VON KNOCHENMARKASPIRATEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dieter Claus

aus Pirna

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang Spier
Referent: Priv. Doz. Dr. med. Irene Boll
Korreferent: Professor Dr. med., Dr. sc. h. c., Dr. med. vet. h. c.,
Dr. med. h. c. Hans Freiherr von Kreß



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 6. Mai 1968

Meiner Mutter
und dem Andenken meines Vaters
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	7
II. Die Vorbereitung des durch Punktion gewonnenen Knochenmarkmaterials für die Messung der absoluten Zellzahl	9
III. Untersuchte Verfahren zur absoluten Zellzählung im Knochenmark	11
A. Die Serummethode nach BAUMGARTEN und BOROVICZÉNY	11
B. Die Methode nach HULSE	13
C. Die Methode zur Herstellung von Zellsuspensionen durch Auflösung der Zellverbände mit Trypsin	15
IV. Zusammenfassende Darstellung der neu entwickelten Methode	20
A. Die Vorbereitung des Gerätes zur Knochenmark-Volumenbestimmung am Tage vor der Sternalpunktion	20
B. Die Vorbereitung der Knochenmarkbröckel zur Volumenbestimmung und die Durchführung der Volumenbestimmung	20
C. Die Herstellung der Zellsuspension aus dem Knochenmark	24
D. Die Auszählung der Zellsuspensionen	26
V. Ergebnisse	26
VI. Diskussion der Ergebnisse	30
A. Zusammenhang von spezifischem Gewicht der Knochenmarkbröckel und absoluter Zellzahl	30
B. Beobachtungen und Messungen von Knochenmark mit inhomogener Zelldichte	32
C. Unterschiedliche Zelldichte im Knochenmark verschiedener Knochen des gleichen Individuums	34
D. Vergleich der durch die angegebene Trypsinstandarmethode ermittelten absoluten Zellzahlen mit den Ergebnissen der routinemäßigen Beurteilung der Zelldichte im Ausstrich	35
VII. Zusammenfassung	36
VIII. Literaturverzeichnis	37
Lebenslauf	

I. Einleitung

In der klinischen Knochenmarkdiagnostik sind gegenwärtig zwei Verfahren der Knochenmarkgewinnung gebräuchlich: die Knochenmarkpunktion (Aspiration) mit der Punktionsnadel nach KLIMA, ROSEGER u. a. und die Knochenmarkbiopsie mit der Trepanationsnadel nach BARTELHEIMER u. a. (die Technik dieser Verfahren ist in den Lehrbüchern der Hämatologie sowie in der klinisch-diagnostischen Literatur beschrieben).

Von den durch Punktion gewonnenen Knochenmarkbröckeln werden Ausstrichpräparate zur zytologischen Diagnostik angefertigt. In gleicher Weise wird auch ein Teil des biotisch gewonnenen Knochenmarkzylinders ausgestrichen und zytologisch beurteilt. Darüber hinaus ermöglicht die histologische Aufarbeitung dieses Zylinders die Beurteilung der Zelldichte und des Fettgehaltes sowie der Architektur des Knochenmarks. Beim Punktionsmaterial dagegen stößt die Feststellung der Zelldichte immer noch auf Schwierigkeiten. Die Beurteilung der Zelldichte im Ausstrich unterliegt nach SANDKÜHLER (-2- S. 91 Spalte 2) dem "alleinigen subjektiven Deuten, bei dem zur Deutung immer erst der Name des Untersuchers die Färbung abgibt." Da die Punktion aber ein wesentlich kleinerer Eingriff ist als die Biopsie, und die Kenntnis der Zelldichte im Knochenmark sowohl für die klinische Diagnostik als auch für die vergleichende Hämatologie Bedeutung hat, ist es wünschenswert, eine verlässliche Methode zur Bestimmung des Zellreichtums (d. h. der absoluten Zahl der kernhaltigen Zellen pro Volumen- oder Gewichtseinheit Knochenmark) im durch Punktion gewonnenen Knochenmark zu finden. Diesem Zweck dient die im folgenden geschilderte Arbeit.

Für die Bestimmung der absoluten Zellzahl im Knochenmarkbröckel sind zwei prinzipiell verschiedene Wege vorgeschlagen worden:

- 1) Aus einer hinsichtlich des Volumens oder des Gewichtes genau be-

stimmten Menge Knochenmark wird eine Zellsuspension hergestellt und in der Zählkammer ausgezählt. Aus dem Zählergebnis erhält man durch entsprechende Umrechnung die Zelldichte im Knochenmarkbröckel.

- 2) Die Zelldichte wird im zytologischen Ausstrichpräparat beurteilt durch Schätzung in verschiedenen mikroskopischen Gesichtsfeldern oder durch Auszählung mit Hilfe des LEITZ-Spezialokulars nach SANDKÜHLER. -

Die historischen Methoden des unter 1) genannten Prinzips sind bei ROHR (S. 13 - 15), bei BAUMGARTEN und BOROVICZÉNY (S. 60 Tab. 1) und bei WEICKER (S. 154) zusammengestellt. Die dabei festgestellten absoluten Zellzahlen sind sehr niedrig.

In neuerer Zeit wurden zwei Methoden angegeben: die modifizierte Serummethode nach BAUMGARTEN und BOROVICZÉNY und die Methode nach HULSE, die im Original zur Bestimmung der absoluten Zellzahl von Rattenknochenmark dient. Beide Methoden, sowie eine Methode zur Herstellung von Zellsuspensionen durch Trypsinbehandlung nach DULBECCO (modifiziert von YOUNGNER), im Original bei der Herstellung von Zellkulturen verwendet, werden, wie nachfolgend beschrieben, auf ihre Eignung zur Bestimmung der absoluten Zellzahl im menschlichen und tierischen Knochenmark geprüft. Wir beachten dabei, daß der Zellverband vollständig in einzelne Zellen aufgelöst wird, die Zellen selbst aber noch als kernhaltige Zellen erkennbar und zählbar bleiben. Mit der Methode, die diesen Anforderungen genügt, ermitteln wir dann bei klinischen Knochenmarkuntersuchungen die absoluten Zellzahlen und vergleichen diese mit den gemäß dem 2. Prinzip routinemäßig durchgeführten Beurteilungen der Zelldichte im Ausstrich.

II. Die Vorbereitung des durch Punktion gewonnenen Knochenmarkmaterials für die Messung der absoluten Zellzahl

Da bei der Kritik der historischen Methoden (ROHR u. a.) immer wieder darauf hingewiesen worden ist, daß die Ergebnisse der absoluten Zellzählung durch die unterschiedliche Blutbeimengung des aspirierten Marks stark differieren, wandten wir unser Augenmerk zunächst auf die Vorbereitung des Knochenmarkmaterials, um für die Messungen ein standardisiertes Ausgangsmaterial zu erhalten.

Wir bringen die Knochenmarkaspirate zuerst in ein Gefäß mit physiologischer Kochsalzlösung, die zur Verhinderung der Blutgerinnung Natriumzitrat enthält. Der Inhalt dieses Gefäßes wird dann durch ein Perlonsieb gegossen, wobei die Markbröckel auf dem Sieb zurückbleiben und durch mehrmaliges Übergießen mit physiologischer Kochsalzlösung vom Blut gereinigt werden. Danach wird die anhaftende Flüssigkeit einheitlich entfernt.

Daß durch diese Vorbehandlung die Knochenmarkzellen nicht geschädigt werden, ist in den Ausstrichen zu erkennen, die von dem so vorbereiteten Material angefertigt wurden (Abb. 1).

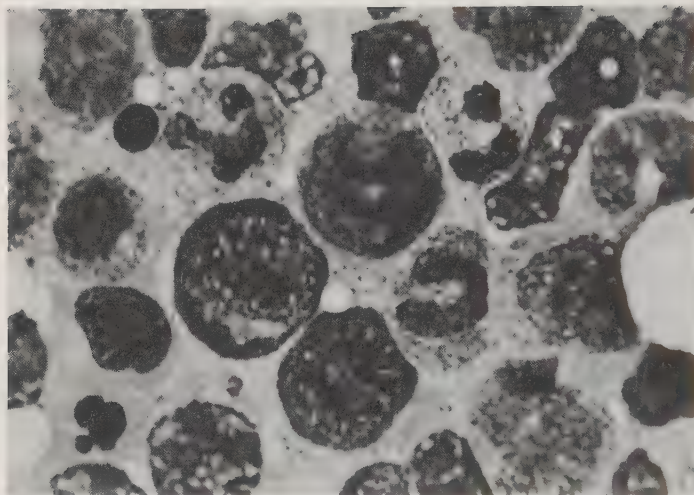


Abb. 1 Ausstrich von Sternalmark, das in der auf S. 9 und 20 ff geschilderten Weise vorbehandelt wurde. Färbung nach PAPPENHEIM, Leitz-Photomikroskop, Ölimmersion

Aus Gründen der besseren Vergleichsmöglichkeit der beim Knochenmark gefundenen Werte mit denen im strömenden Blut, und weil die für die Volumenbestimmung benötigten Geräte leichter zu beschaffen sind als eine mit der erforderlichen Genauigkeit arbeitende Waage, haben wir die Menge Knochenmark nicht nach Gewicht, sondern als Volumen bestimmt. Wir bringen dazu die Knochenmarkbröckel in ein Meßröhrchen, das eine vorher bestimmte Menge physiologische Kochsalzlösung enthält. Die Menge Knochenmark ergibt sich aus dem aufsteigenden Flüssigkeitsspiegel.

Auf diese Weise (das ganze Verfahren ist im einzelnen in Abschnitt IV. geschildert) bereiten wir das Knochenmark einheitlich vor. Es soll nun versucht werden, mit jeder der drei oben genannten Methoden daraus Zellsuspensionen herzustellen, die für den Zweck der Bestim-

mung der absoluten Zellzahl im Knochenmark geeignet sind.

III. Untersuchte Verfahren zur absoluten Zellzählung im Knochenmark

A

Die Serummethode nach FELDSTEIN, ENDICOTT u. a. wurde zuletzt von BAUMGARTEN und BOROVICZÉNYY modifiziert: Die Knochenmarkbröckel werden gewogen, in AB-Serum mit einem Glasstab mechanisch zerkleinert und für etwa eine Stunde bei 37°C in einen Brutschrank gestellt. Das aus dem Brutschrank entnommene Gefäß wird einige Male umgekippt und das die Zellen enthaltende Serum in die Zählkammer gefüllt (BAUMGARTEN und BOROVICZÉNYY S. 57 f.).

Ergebnisse eigener Versuche (Versuch Nr. 4a und Messung Nr. 26a): Obgleich wir energisch versuchten, die Knochenmarkbröckel in dem Serum mit dem Glasstab mechanisch zu zerkleinern, lösten sie sich auch nach der Aufbewahrung im Brutschrank weder im patienteneigenen (Versuch Nr. 4a) noch im AB-Serum (Messung Nr. 26a) vollständig auf. Die im Serum verbliebenen Bröckel wurden ausgestrichen und erwiesen sich als nicht gelöste Zellverbände. Ähnliche Beobachtungen sind auch von YOFFEY (S. 194) beschrieben worden.

Im Vergleich zu den auf andere Weise hergestellten Zellsuspensionen befinden sich im Serum auffällig viele Erythrozyten. Es liegt nahe, dabei an eine Entkernung kernhaltiger Zellen während der Bebrütungszeit zu denken.

Beurteilung: Auf Grund der durch dieses Verfahren nachgeahmten physiologischen Bedingungen werden die Zellen gegenüber anderen Methoden weitgehend geschont. Es gelingt jedoch nicht, die Zellverbände auf diese Weise vollständig aufzulösen. Daher muß die Serummethode als nicht brauchbar bezeichnet werden.

Versuch Nr.	Name Geschlecht Alter	Hämatol. Diagnose	geschätzte Zelldichte i. Ausstrich	KM schwimmt (1) schwebt (2) sedimentiert (3) in der Auf- fangflüssigk.	Menge d. Mat. mm ³	Besonderheiten u. Pa- rallelversuche	Zellzahl ($\cdot 10^6$ / mm ³ KM)
1	E. D. ♂ 76 J.	behandelter M. BIERMER		1	11,0	HULSE-Methode	0,07
2	K. M. ♀ 69 J.	Eosinophilie, sonst normal		1	8,0	Trypsin	0,40
2a	- " -	- " -		1	3,0	Parallelversuch zu Nr. 2 mit der HULSE- Methode	0,26
3	M. U. ♀ 54 J.	KM angeregt	sehr mäßig	1	2,0	Trypsin	0,30
4	F. O. ♂ 72 J.	behandelter M. BIERMER	mäßig	1	nicht registr.	Trypsin	0,56
4a	- " -	- " -	- " -	1	- " -	Parallelversuch zu Nr. 4 mit patienten- eigenem Serum	0,33
5	A. S. ♀ 75 J.	Retikulose	sehr zellreich	3	4,0	Trypsinlösung 0,25 %	1,30
5a	- " -	- " -	- " -	3	10,0	Parallelversuch zu Nr. 5 mit 0,8 % Trypsinlösung	2,40
6	B. N. ♂ 61 J.	Verdacht auf Retothelsarkom	mittel	2	1,7	Trypsin	0,93
7	P. L. ♂ 70 J.	KM unauffällig	mittel	1 u. 3	1,8	Trypsin	0,70
7a	- " -	- " -	- " -	- " -	2,1	Parallelversuch zu Nr. 7 mit Trypsin- lösung	1,06

Tab. I Versuche, die dem Vergleich der Serummethode, der Methode nach HULSE und der Trypsinmethode miteinander, sowie der Ausarbeitung der Trypsinstandardmethode dienen (zu dem letzteren siehe auch Tab. II).

Die mit a) gekennzeichneten Parallelversuche wurden zu gleicher Zeit mit dem jeweils gleichen Knochenmark wie die Hauptversuche durchgeführt.

(KM = Knochenmark)

B

Die Methode nach HULSE ist im Original (S. 51) zur Bestimmung der absoluten Zellzahl von Rattenknochenmark angegeben worden. Das Prinzip ist das gleiche wie das der Serummethode, nur wird als Dispersionsmittel statt Serum 1 ml von folgendem Gemisch verwendet:

Dipropylenglykol	25 ml
dihydriertes Natriumzitrat 20 %	15 ml
Aqua dest.	ad 100 ml.

Das im Dispersionsmittel befindliche Knochenmark wird nicht bei 37°C aufbewahrt, sondern stattdessen 5 Minuten kräftig geschüttelt.

Ergebnisse eigener Versuche (Vorversuche, sowie Versuche Nr. 1 und 2): In Vorversuchen lieferte die Methode bei Rattenknochenmark eine brauchbare Zellsuspension, allerdings erst nach einer wesentlich längeren Schüttelzeit (15 - 20 Minuten) als von HULSE angegeben. Knochenmarkbröckel vom Menschen lösen sich auch nach mehr als einstündigem kräftigen Schütteln nicht vollständig auf, stattdessen war nach 1 Stunde ein deutlicher Zellzerfall nachweisbar. Wir haben, um dies zu objektivieren, eine Probe der Zellsuspension jeweils nach 7, 15, 30, 60 und 120 Minuten Schüttelzeit ausgezählt und das Ergebnis grafisch dargestellt (Abb. 2).

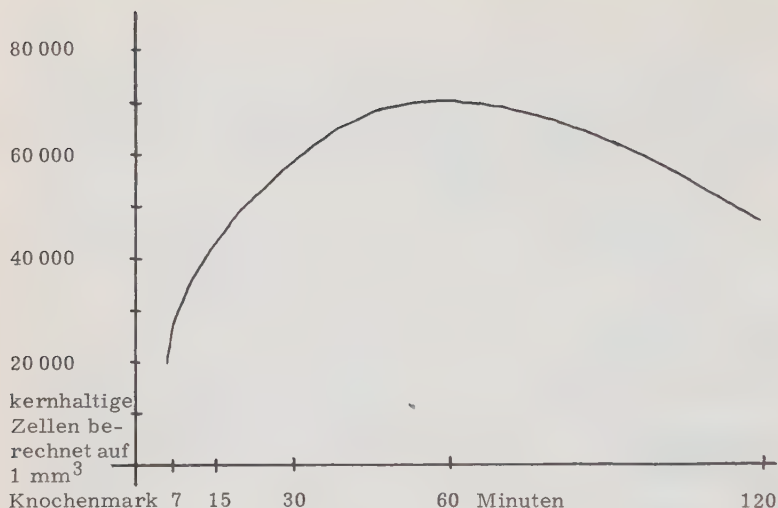


Abb. 2 Zellzahl in der Suspension nach HULSE in Abhängigkeit von der Schüttelzeit (in Min.). Menschliches Knochenmark, Versuch Nr. 1.

Beim Versuch Nr. 2 haben wir die absolute Zellzahl mit der Methode nach HULSE bestimmt und daneben eine vergleichende Zellzahlbestimmung durchgeführt, bei der zur Herstellung der Zellsuspension eine relativ starke Trypsinlösung (0,5 %) verwendet wurde. Es ergab sich für die Trypsinsuspension fast die doppelte Zellzahl ($0,40 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ Knochenmark) gegenüber dem Versuch mit dem Lösungsmittel nach HULSE ($0,26 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ Knochenmark). In diesem Zusammenhang fällt auch auf, daß die absoluten Zellzahlen, die HULSE für Rattenknochenmark angibt, um mehr als 20 % niedriger liegen als die Werte, die mit unserer in Abschnitt IV. beschriebenen standardisierten Trypsinmethode gefunden wurden (vgl. dazu Tab. IV). Beurteilung: Die Methode nach HULSE kann zur Bestimmung der absoluten Zell-

zahl von menschlichem Knochenmark nicht als brauchbar bezeichnet werden, da das Dispersionsmittel die Zellen zerstört, bevor die Zellverbände vollständig aufgelöst sind.

C

Die Methode zur Herstellung von Zellsuspensionen durch Auflösung der Zellverbände mit Trypsin wurde ursprünglich von DULBECCO (1952) für virologische Zwecke angegeben und von YOUNGNER (1954) zur Suspendierung von Nierenzellen für Zellkulturen modifiziert. Wir fanden die Methode dargestellt bei ŘEŘÁBEK (S. 154 - 157). Die Gewebstücke werden in einer 0,25 %igen Lösung von Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung nach DULBECCO 10 Minuten bei 37°C bebrütet. Danach wird die Trypsinlösung abgegossen und in einer in Eis gestellten Vorratsflasche aufbewahrt. Zu dem Gewebsbrei gibt man nun frische Trypsinlösung und behandelt auf dem Wasserbad mit langsam laufenden Propeller- oder Magnetührwerk 10 Minuten lang. Es darf sich dabei kein Schaum bilden. Man kann aber auch das Gefäß einfach in der Hand schütteln. Die überstehende Trypsinlösung wird danach in die eisgekühlte Vorratsflasche gebracht, frische Trypsinlösung dem Gewebsbrei zugegeben und dieser Vorgang im ganzen 8 - 20 mal wiederholt. Danach ist das Ausgangsmaterial schon praktisch zellfrei. Schließlich wird die in der Vorratsflasche befindliche gesammelte Zellsuspension durch eine Lage Mull filtriert und etwa 5 mal je 2 Minuten bei 600 - 1000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert, dazwischen jeweils in Nährmedium resuspendiert. -

Diese Methode muß für Knochenmarkuntersuchungen den Erfordernissen einer quantitativen Zellzahlbestimmung angepaßt werden, für die nur kleine Mengen Untersuchungsmaterial zur Verfügung stehen. Das gilt im einzelnen

1. für die Größe der verwendeten Gefäße,
2. für die Konzentration der Trypsinlösung,
3. für die Bebrütungsdauer,

4. für die Schütteltechnik und
5. für die Trypsininhibierung.

ad 1) Da vom Sternalpunktat für unsere Untersuchungen durchschnittlich nur etwa 4 mm³ Knochenmark zur Verfügung standen, wurden entsprechend kleine Gefäße verwendet, um die Fehlermöglichkeit, die durch an den Gefäßwänden haftengebliebene Zellen gegeben ist, möglichst gering zu halten. Die von uns verwendeten Gefäße (Abb. 3 - 6) sind in Abschnitt IV. beschrieben.

ad 2) Bei den ersten Versuchen zeigte sich, daß die Zellsuspensionen, die mit Trypsinkonzentrationen von 0,5 % und 0,25 % hergestellt wurden, erhebliche Mengen von Zelltrümmern aufwiesen. Entsprechend niedrig sind die absoluten Zellzahlen bei diesen Versuchen. Es lag daher nahe, Versuche mit geringeren Trypsinkonzentrationen anzustellen (vgl. Tab. II Sp. B). Dabei lösten sich aber die Knochenmarkbröckel nach der ersten Trypsinbehandlung bei 37°C und dem nachfolgenden Schütteln nicht vollständig auf. Wir haben deshalb in Anlehnung an die Originalmethode die nicht gelösten Reste der Knochenmarkbröckel ausgefiltert und noch einmal mit frischer Trypsinlösung behandelt. Für nahezu alle Versuche, bei denen mit Trypsinkonzentrationen von 0,25 % und geringer gearbeitet wurde, erwies sich diese zweite Behandlung der Knochenmarkbröckelreste als notwendig. In einem Fall (Messung Nr. 11a) zeigte eine Behandlung der Knochenmarkbröckel mit 0,015 %iger Trypsinlösung ein annähernd gleiches Ergebnis wie die gleichzeitig durchgeführte Messung bei Anwendung einer Trypsinkonzentration von 0,05 % (Messung Nr. 11). Hierbei handelte es sich aber, wie sich beim Schütteln herausstellte, um ein besonders leicht lösliches Knochenmark. Da sich anderes Knochenmark bei den Versuchen und Messungen als weniger gut und schnell löslich erwiesen hat, halten wir es für ratsam, die Trypsinkonzentration von 0,05 % nicht zu unterschreiten, um gleiche Bedingungen für alle Messungen zu haben. Bei der Konzentration von 0,05 % haben sich mit einer Ausnahme alle Knochenmark-

A Versuch Nr.	B Trypsin- Konzentration	C Bebrütungszeit bei 37°C	D Schüttel- zeit	E Bebrütungszeit des Filterrück- standes bei 37°C	F Schüttelzeit des Filter- rückstandes	G Zellzahl ($\cdot 10^6 /$ $\text{mm}^3 \text{KM}$)
2	0,5 %	45 Min.	3 Min.	-	-	0,40
3	0,5 %	45 Min.	5 Min.	-	-	0,30
4	0,25 %	10 Min.	2 Min.	5 Min.	1 Min.	0,56
5	0,25 %	10 Min.	2 Min.	7 Min.	2 Min.	1,30
5a	0,08 %	20 Min.	2 Min.	7 Min.	2 Min.	2,40
6	0,08 %	20 Min.	2 Min.	7 Min.	2 Min.	0,93
7	0,05 %	45 Min.	1 Min.	-	-	0,70
7a	0,05 %	15 Min.	1 Min.	-	-	1,06
Standard- methode	0,05 %	15 Min.	50 Sek.	7 Min. (- 10 Min.)	50 Sek.	-

Tab. II Ermittlung der günstigsten Trypsinkonzentration sowie der jeweils kürzesten Bebrütungs- und Schüttelzeit bei der Trypsinmethode. Bei den Versuchen Nr. 5 und Nr. 7 wurden vergleichende Versuche (Nr. 5a bzw. Nr. 7a) mit KM aus demselben Sternalpunktat angestellt.

- (KM = Knochenmark)

bröckel unserer Versuchs- und Meßreihen während des Schüttelns nach der zweiten Trypsinbehandlung vollständig aufgelöst. Falls dies nicht geschehen wäre, hätte man ein zweites Mal filtrieren und den Filterrückstand einer dritten Trypsinbehandlung unterziehen können. Dies haben wir bei der erwähnten Ausnahme, - die sich dadurch erklären läßt, daß die Temperatur im Brutschrank nur 35°C betrug, - getan (Messung Nr. 24).

Da mit der Zellsuspension keine Kultivierung beabsichtigt war, wurde das Trypsin der Einfachheit halber statt in der von DULBECCO angegebenen phosphatgepufferten Salzlösung in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

ad 3) Die Zeit, während der die Knochenmarkbröckel in der Trypsinlösung bei 37°C aufbewahrt werden, wurde bei den Versuchen, die wir zur Ausarbeitung der Standardmethode anstellten, von 45 Minuten auf 15 Minuten reduziert (vgl. Tab. II Sp. C). Aus den Versuchen Nr. 5 und 5a geht hervor, daß die Knochenmarkzellen durch eine hohe Trypsinkonzentration bei unserer Behandlung mehr geschädigt werden als durch eine längere Bebrütungszeit. Andererseits wirkt sich aber auch eine sehr lange Bebrütungszeit zellschädigend aus (Versuch Nr. 7 und 7a). Diese Schlußfolgerungen haben wir aus verschiedenen Versuchen mit dem gleichen Knochenmark gezogen, wobei wir die Zahlen der jeweils in den Suspensionen gezählten Zellen gegenüberstellten (Versuche Nr. 5 und 5a, sowie Nr. 7 und 7a) und außerdem den Zustand der Zellen in den Suspensionen beurteilten. Da die Zellen in Versuch Nr. 7a nach der Suspensierung sehr gut erhalten waren, wurde die in diesem Versuch angewendete Bebrütungszeit von 15 Minuten sowie die Trypsinkonzentration von 0,05 % als Standardmethode festgelegt. Der Filtrerrückstand, also der Teil der Knochenmarkbröckel, der sich nach der ersten Behandlung noch nicht aufgelöst hat, wird mit frischer Trypsinlösung 7 - 10 Minuten bebrütet, je nach dem, ob nach der ersten Behandlung nur noch wenige Reste oder aber ganze Bröckel sichtbar bleiben (vgl. Tab. II Sp. E).

ad 4) Im Original ist ein Magnetrührer angegeben, durch den die Gewebsauflösung mechanisch beschleunigt werden soll. Bei unseren Versuchen mit verschiedenen großen vom Magnetrührer bewegten Stahlstiften sowie mit verschiedenen Geschwindigkeiten des Magnetrührers wurde eine vollständige Auflösung der Knochenmarkbröckel nicht erzielt. Da sich bei eingeschaltetem Gerät das Gewebematerial infolge der Zentrifugalkraft am Gefäßrand sammelt, erscheint uns die Bewegung des Rührers für die Auflösung von Zellverbänden wesentlich weniger zweckmäßig als die des Schüttelns. -

Die Kräfte, die beim Schütteln auf den in der Trypsinlösung befindlichen Zellverband einwirken, werden außer durch die Schüttelkraft auch von der Form des benutzten Gefäßes und vom Flüssigkeit/Luft-Verhältnis im Gefäß bestimmt. Diese Faktoren sind also möglichst konstant zu halten, um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen. Wir halten es für erforderlich, die Schütteltechnik, die wir näher in Abschnitt IV. beschreiben, anhand des Zustandes der Zellen in der Suspension nachfolgend stets zu kontrollieren, um nicht gegebenenfalls auch bei weiteren Messungen die Zellen durch zu kräftiges Schütteln zu zerstören. Um dieser Kontrolle willen ist die Auszählung in der Kammer nach SCHILLING unter dem Mikroskop empfehlenswerter als die elektronische Auszählung.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die Schüttelzeit mit jeweils 50 Sekunden konstant zu halten.

ad 5) In der Originalmethode wird die Zellsuspension durch mehrfaches Zentrifugieren vom Trypsin befreit. Das kann für die quantitative Zellzahlbestimmung nicht übernommen werden, da die Knochenmarkzellen nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 600 - 1000 Umdrehungen/Min. nicht vollständig sedimentierten, durch höhere Umdrehungszahlen aber geschädigt werden. Deshalb muß das Trypsin in der Suspension inhibiert werden. Außer der bei ŘEŘÁBEK angegebenen Trypsininhibierung durch Kälte verwenden wir LUGOLsche Lösung, da nach LEUTHARDT (S. 181) die SH-Gruppen der Fermente durch sehr

verdünnte Jodlösung blockiert werden. Der Zellsuspension werden, bevor sie im Eiswasser gekühlt wird, pro 2 ml je ein Tropfen LUGOLsche Lösung zugefügt. Die Zellzahl in den Suspensionen erhält sich danach bis über 150 Minuten konstant. Um bei der mikroskopischen Auszählung eine schnelle Wiedererwärmung der Suspension zu vermeiden, wird vor den Kondensor ein Blaufilter eingeschaltet. - Versuche mit dem Trypsininhibitor "Trasylol" (BAYER) ergaben bei Zusatz von 1 ml "Trasylol" auf 3 ml Zellsuspension nach 30 Minuten 25 % weniger Zellen als bei der parallel durchgeführten Trypsininhibierung durch Kälte und Jod (Messung Nr. 10). Das mag dadurch zu erklären sein, daß die Wirkung von "Trasylol" erst nach 2 Stunden einsetzt.

IV. Zusammenfassende Darstellung der neu entwickelten Methode

A. Die Vorbereitung des Gerätes zur Knochenmark-Volumenbestimmung am Tage vor der Sternalpunktion

Mittels einer Dreikantfeile werden Pipetten, bei denen der Abstand zwischen zwei Teilstrichen 2 mm^3 entspricht, in etwa 3 cm lange Stücke zerschnitten. Wir benutzen nur die regelmäßig graduierten Stücke aus dem Mittelteil der Pipetten, reinigen sie peinlich genau mit Spülmittel, heißem Wasser, Alkohol und Aqua bidest., lassen sie trocknen und verschließen jeweils ein Ende mit einem Tropfen UHU-Alleskleber. Nach 24-stündigem Trocknen hat der Alleskleber die Festigkeit, die eine genaue Messung gewährleistet. Andererseits läßt er sich noch gut mit der Pinzette vom Glas entfernen.

B. Die Vorbereitung der Knochenmarkbröckel zur Volumenbestimmung und die Durchführung der Volumenbestimmung

Aus der 20 ml-Rekordspritze, mit der das Knochenmark aus dem Sternum aspiriert worden ist, wird der für die Bestimmung der ab-

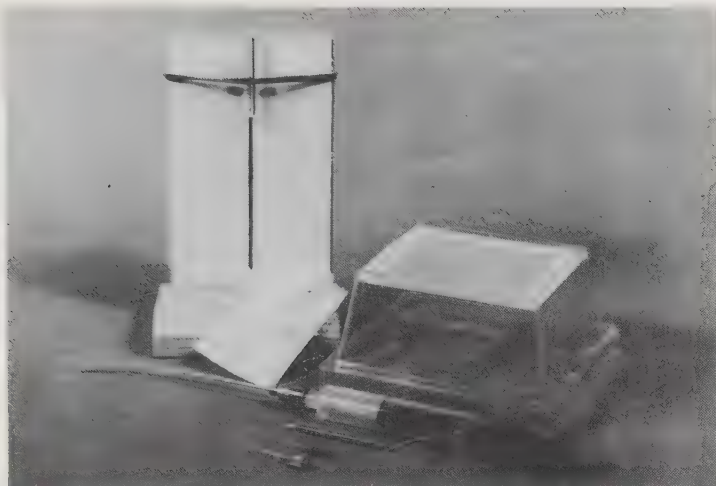


Abb. 3 Gerät zur Volumenbestimmung von Knochenmark:
Stativ mit Pipettenstück, Filterpapierstreifchen,
Perlonsieb (Fa. NUOVO), 2 ml-Spritze mit Kanüle
und Polyäthylenschlauch, zahnmedizinische Drahtspiralen

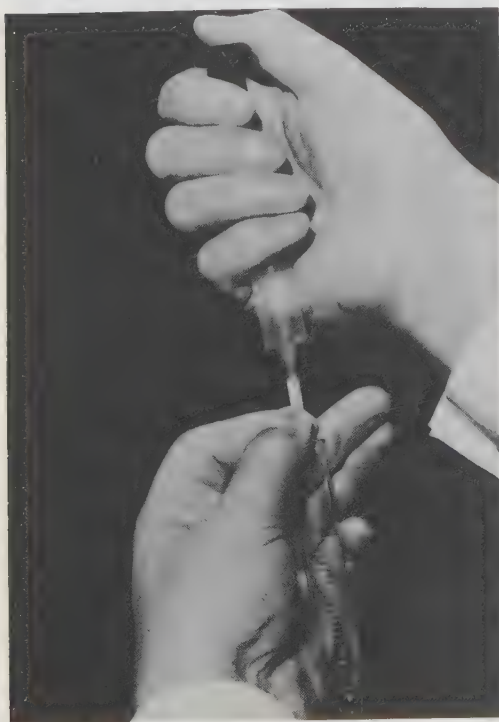


Abb. 4 Das Knochenmark wird
mit vorge-
wärmter
Trypsinlö-
sung aus
dem zur Vo-
lumenbestim-
mung ver-
wendeten Pi-
pettenstück
in ein Zentri-
fugenglas ge-
spült

soluten Zellzahl bestimmte Anteil des Sternalpunktates in ein Zentrifugenglas entleert, das mit 8 ml physiologischer Kochsalzlösung und 2 ml 3,8 %iger Natriumzitratlösung gefüllt ist. (Entsprechendes gilt für das aus Rattenfemuren herauspräparierte ebenso wie für das vom Hund durch Sternalpunktion und durch Ausquetschen eines Stückchens Rippe gewonnene Knochenmark.) Das Glas wird mit einem Gummistopfen verschlossen und mehrfach umgeschüttelt. Die am Vortage - wie oben geschildert - vorbereiteten Pipettenstücke werden nun mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Dies geschieht mit einer 2 ml-Injektionsspritze, auf deren Kanülenende ein dünner Polyäthylenschlauch geschoben ist, der mit seinem freien Ende in das Pipettenstück eingeführt wird. Mit kräftigem Druck wird die Lösung eingespritzt. Es dürfen sich keine Luftblasen mehr im Meßraum befinden. Mit Hilfe von sehr schmalen Filterpapierstreifen wird aus dem vollständig mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Pipettenstück die Lösung genau bis zum 3. - oder wenn reichlich Knochenmark zur Verfügung steht, bis zum 4. - Teilstrich unter dem offenen Glasrand wieder abgesaugt. Dabei ist darauf zu achten, daß an der Innenwand keine Tröpfchen haften bleiben. Das Pipettenstück wird dann mit einem Gummiring an einem Holzstativ (Abb. 3) befestigt und möglichst nicht mehr berührt, um nicht durch die Körperwärme eine stärkere Verdunstung herbeizuführen. Unmittelbar bevor das Knochenmark in das Röhrchen eingebracht wird, wird der Flüssigkeitsspiegel noch einmal kontrolliert.

Nun wird festgestellt und im Meßprotokoll notiert, ob das Knochenmark, das sich in der oben beschriebenen Auffangflüssigkeit im Zentrifugenglas befindet, an der Flüssigkeitsoberfläche schwimmt, in der Flüssigkeit schwebt oder in die Spitze des Zentrifugenglases sedimentiert ist. Diese Beobachtung läßt schon, wie sich später erwies, eine orientierende Beurteilung des Zell- bzw. Fettgehaltes im Knochenmark zu. Danach wird der Inhalt des Zentrifugenglases durch ein Perlonsieb mit einer offenen Maschenweite von $0,125 \text{ mm}^2$ gegossen. Wir verwenden hierfür ein sog. Artemia-Sieb der Firma NUOVO, wie es in der Aquaristik benutzt wird. Die auf dem Sieb verbleibenden

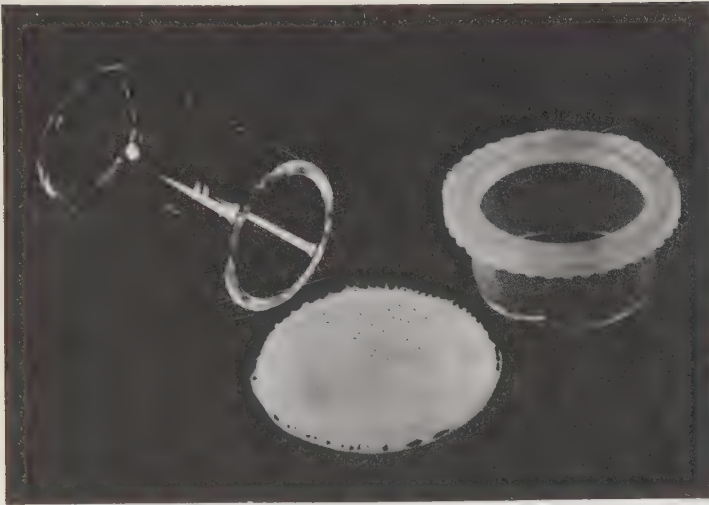


Abb. 5 Filter, bestehend aus Glasrohr, Plastikring
und Filterblatt (Nylonstoff)



Abb. 6 Filtrieren
nach der
1. Trypsinbe-
handlung.
Erläuterung
S. 25

Knochenmarkbröckel werden durch mehrmaliges Übergießen mit physiologischer Kochsalzlösung von dem anhaftenden Blut befreit. Danach wird die Flüssigkeit von der Unterseite des Siebes gleichmäßig mit Zellstofftupfern abgesaugt, bis sich zwischen den freien Maschen kein Tröpfchen mehr befindet. Sofort wird jetzt das Knochenmark vom Sieb in das vorbereitete und nochmals kontrollierte Pipettenstück gebracht. Dies geschieht vorteilhaft mit Stahlspiralen, wie sie in der Zahnmedizin Verwendung finden (Wurzelfüllinstrument nach LENTULO, Feile nach HEDSTRÖM, Schraube nach KERR - Abb. 3). Bei geschicktem Arbeiten benetzen sich die Spiralen nicht mit der zum Messen in dem Pipettenstück befindlichen physiologischen Kochsalzlösung. Man kann mit den Spiralen auch die gelegentlich zusammen mit dem Knochenmark eingebrachten Luftblasen gut entfernen.

Die Menge des Knochenmarkmaterials, am günstigsten $2 - 6 \text{ mm}^3$, wird am Aufsteigen des Flüssigkeitsspiegels in dem Pipettenstück gemessen. Falls es erforderlich ist, lassen sich Zwischengrade zwischen den Teilstrichen durch einen Nonius bestimmen oder auch abschätzen.

C. Die Herstellung der Zellsuspension aus dem Knochenmark

Nachdem im Meßprotokoll vermerkt wurde, wieviel Knochenmark in das Pipettenstück eingebracht worden ist, wird dieses mit dem offenen Ende nach unten über ein vorher im Brutschrank auf 37°C angewärmtes graduiertes Zentrifugenglas gehalten. Der UHU-Pfropf wird mit einer spitzen Pinzette entfernt. Danach durchspült man das Pipettenstück kräftig mit einer frisch bereiteten und auf 37°C vorgewärmten 0,05 %igen Lösung von Trypsinum purum ("Trypure Novo") in physiologischer Kochsalzlösung unter Zuhilfenahme einer 10 ml-Spritze, so daß die Knochenmarkbröckel vollständig in das Zentrifugenglas gespült werden (Abb. 4). Je nach Menge des Materials verwendet man zum Durchspülen 4 - 6 ml Trypsinlösung. Das Zentrifugenglas, das Knochenmark und Trypsinlösung enthält, wird mit einem

Gummistopfen verschlossen und für 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Danach wird es 50 Sekunden lang mäßig stark mit der Hand geschüttelt. Wir bewegen dabei das Glas auf der vom Unterarm beschriebenen bogenförmigen Strecke von etwa 25 cm in 50 Sekunden ungefähr 125 mal hin und her. Nun wird der Inhalt des Zentrifugenglases durch ein Filter (Abb. 5 und 6) gegossen, das aus einem Glasröhrchen von 30 mm Länge und 12 mm lichter Weite, einem darauf passenden Plastikring und dem Filterblatt besteht. Das Filterblatt wurde mit der erhitzten Öffnung eines Erlenmeyerkolbens heiß aus gewirktem Nylonhemdenstoff herausgestanzt. Dieses Gewebe läßt, wie wir in allen Versuchen und Messungen feststellen konnten, keine Zellverbände, sondern nur Einzelzellen passieren. - Bis zur Verwendung bewahren wir die Filterblätter zwecks besserer Benetzbarkeit in Aqua dest. auf.

Das Filtrat, die Knochenmarkzellsuspension, wird in einem weiteren graduierten Zentrifugenglas aufgefangen und mit je einem Tropfen LUGOLscher Lösung pro 2 ml Suspension versehen. Das Zentrifugenglas verschließt man dann mit einem Gummistopfen, schüttelt es kurz um und stellt es bis zum Auszählen in Eiswasser.

Vorsichtig wird nun das aus dem Filter gelöste Filterblatt mit dem Filterrückstand in das erste graduierte Zentrifugenglas gebracht und mit 4 - 6 ml auf 37°C vorgewärmter Trypsinlösung übergossen. Dabei wird gleichzeitig das Glasrohr des Filters von innen ausgespült, damit dort keine Zellen mehr haften bleiben.

Je nach dem, ob sich die Knochenmarkbröckel nach der ersten Behandlung schon weitgehend aufgelöst haben oder nicht, wird 7 - 10 Minuten bei 37°C bebrütet, danach 50 Sekunden geschüttelt, pro 2 ml Suspension 1 Tropfen LUGOLsche Lösung zugefügt, umgeschüttelt und gekühlt.

D. Die Auszählung der Zellsuspensionen

Nacheinander werden die beiden Zentrifugengläser mit den Zellsuspensionen aus dem Eiswasser genommen. Durch vorsichtiges Umschütteln in drei Ebenen sorgt man für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Suspension. Dabei darf sich kein Schaum bilden. Die Auszählung erfolgt unter dem Mikroskop (Okular 12.5, Objektiv 25/0.65) mit Blaufilter vor dem Kondensor in der Zählkammer nach SCHILLING.

Es werden die mit der angegebenen Vergrößerung gut erkennbaren kernhaltigen Zellen in zweimal 5 Feldern von je 1 mm^2 Fläche ausgezählt. Das ergibt die Zellzahl in 1 mm^3 der Suspension. Diese Zahl wird mit der Menge der Suspension (in mm^3) multipliziert.

Die Auszählung der ersten und der zweiten Suspension erfolgt getrennt. Bei der zweiten Suspension, in der sich das Filterblatt befindet, ist dessen Volumen abzuziehen. Wir haben dieses unmittelbar nach dem Ausstanzen durch Eintauchen des Filterblattes in ein mit Wasser gefülltes graduiertes Zentrifugenglas bestimmt.

Die errechneten Gesamtzellzahlen der beiden Suspensionen werden addiert, und die Summe wird durch die Menge (in mm^3) des für die Messung verwendeten Knochenmarks dividiert, wodurch man die absolute Zahl der kernhaltigen Zellen pro 1 mm^3 Knochenmark erhält.

V. Ergebnisse

Mit der von uns ausgearbeiteten Trypsinstandardmethode haben wir in der Zeit vom 18. 8. 1965 bis zum 8. 8. 1966 die absolute Zellzahl in 42 Knochenmarkproben von routinemäßig bei Patienten des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln durchgeführten Sternalpunktionen bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle III. zusammengestellt (Spalte G). Beigefügt sind die hämatologische Diagnose (Spalte C),

A	B	C	D	E	F	G
Lfd. Nr.	Name, Geschlecht, Alter	Hämatol. Diagnose	geschätzte Zelldichte i. Ausstr.	KM Menge ₃ in mm	KM schwimmt (1), schwebt (2), sedimentiert (3) i. d. Auffang- flüssigkeit	Zellzahl ($\cdot 10^6/\text{mm}^3$)
1	J. S. ♀ 57 J.	- Beckenkammpunktion		2,0	1	0,29
2	E. S. ♀ 65 J.	hyperchrome Anämie	mäßig	4,1	1	0,41
3	A. G. ♀ 71 J.	unauffällig	gut	4,5	1	0,47
4	H. G. ♂ 79 J.	linksverschobene Erythropoese, Megaloblastoide	mäßig	6,1	1	0,48
5	H. W. ♂ 55 J.	Granulopoese u. u. Plasmazellen vermehrt	mäßig	4,0	1	0,50
6	E. E. ♀ 66 J.	normales KM	mittel	6,1	1	0,50
7	H. G. ♂ 56 J.	normales KM	mäßig	5,2	1	0,51
8	H. S. ♀ 52 J.	plasmazelluläre Reaktion	mäßig	4,1	1	0,52
9	E. B. ♂ 59 J.	normales KM	reichlich	8,5	1	0,55
10	E. B. ♀ 85 J.	Eisenmangel- anämie	nicht beur- teilt	3,9	1	0,56
11	M. D. ♀ 62 J.	Anämie d. Rei- fungsstörung d. roten Reihe	sehr zell- reich	4,0	1	0,56
11a	- " -	- " -	- " -	2,0	1	0,55
12	E. S. ♀ 75 J.	angeregte Ery- thropoese, Gra- nulopoese links- verschoben	zellreich	6,0	1	0,57
12a	- " -	- " -	- " -	1,48	1	0,49
13	E. B. ♂ 60 J.	unauffällig	nicht beur- teilt	4,0	1	0,61
14	E. S. ♀ 66 J.	KM hypoplas- tisch, Ery- thropoese ange- regt	sehr zell- arm	4,1	1	0,65
15	F. S. ♀ 78 J.	beginnender M. BIERMER	mittel	4,7	1	0,67
16	W. S. ♂ 55 J.	linksverschobene Erythropoese	mittel	2,0	2	0,72
17	B. S. ♀ 56 J.	Reifungshemmung d. Leukopoese	reichlich	6,0	1	0,77
18	M. N. ♀ 54 J.	unauffällig	arm bis mäßig	3,5	2	0,78
19	K. M. ♂ 61 J.	normales KM	mäßig	2,0	2	0,83
20	K. B. ♂ 76 J.	sideroachrestis- che Anämie	zellreich	2,0	2	0,86
21	R. S. ♂ 61 J.	hypoplastische Erythropoese	zellarm	3,3	2	0,90
22	F. L. ♂ 78 J.	M. BIERMER	mäßig	2,0	3	0,94
23	W. K. ♂ 56 J.	Leukozytose	normal	5,0	3	0,96
24	H. K. ♀ 73 J.	KM hyperrege- nerativ	sehr zell- dicht	4,0	3	1,01
25	M. B. ♂ 84 J.	sideroachrestis- che Anämie	mittel	2,0	3	1,09
26	E. K. ♀ 65 J.	Chron. myeloische Leukämie	mäßig	4,0	3	1,56
26a	- " -	- " -	- " -	4,0	3	0,51

Fortsetzung auf S. 28

Fortsetzung Tabelle III

27/1	E. W. ♀ 57 J.	KM angeregt	gut	7,0	1 (3/4)	0,46
27/2	- " -	- " -	- " -	5,0	3 (1/4)	1,10
28/1	E. B. ♀ 72 J.	Myeloblasten-leukämie	zell- u. fettreich	4,2	1 (7/8)	0,69
28/2	- " -	- " -	- " -	2,1	3 (1/8)	1,24
29	A. B. ♀ 51 J.	lymphatische Leukämie	Sternalpunktion erbrachte kein KM			
30	M. S. ♂ 52 J.	normales KM	gering	1,3	nicht registriert	0,46
31	H. G. ♀ 25 J.	hypoplastisches KM mit Eosinophilie	sehr gering	0,8	2	0,64
32	G. M. ♀ 62 J.	KM unauffällig	mäßig	0,8	1	0,85
33	H. P. ♀ 21 J.	angeregte Erythropoese	zellreich	0,8	1 (1/2) u. 3 (1/2)	1,02
34	F. D. ♀ 57 J.	Blutungsanämie	spärlich	0,6	2	1,13
35	K. K. ♂ 75 J.	-	-	0,3	3	1,20
36	E. W. ♀ 67 J.	Verdacht auf maligne Retikulo-se	gut	0,7	3	1,33
37	E. K. ♀ 66 J.	Chron. myeloische Leukämie	sehr zellreich	1,0	3	2,05
38	A. F. ♀ 52 J.	Polyzythämia vera	zellreich	1,0	3	2,13
39	B. L. ♀ 88 J.	M. BIERMER	gut	4,2	1 (3/4) u. 3 (1/4)	0,32
40	O. S. ♀ 84 J.	makroblastische Erythropoese, atypische Plasmazellen	mittel	4,0	1 (4/5) u. 3 (1/5)	0,62
41	E. J. ♀ 79 J.	Erythropoese gesteigert, megaloblastoide Zellen	mäßig bis reichlich	6,0	1 (3/4) u. 3 (1/4)	0,94
42	F. F. ♀ 67 J.	Reifungshemmung der Granulopoese	mäßig bis reichlich	4,0	1 (2/3) u. 3 (1/3)	1,00
43	J. F. ♀ 68 J.	KM angeregt	zellreich	4,1	1 (1/3) u. 3 (2/3)	1,16

Tab. III Bestimmungen der absoluten Zellzahl im KM von routinemäßig durchgeführten Sternalpunktionen (Messung Nr. 1: Beckenkammpunktion) bei Patienten des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln in der Zeit vom 18. 8. 1965 bis zum 8. 8. 1966 mit der Trypsinstandardmethode
(KM = Knochenmark)

die im Ausstrichpräparat geschätzte Zelldichte (Spalte D), die Menge Knochenmark, die für unsere Untersuchung zur Verfügung stand (Spalte E) sowie die Beobachtung, ob das Knochenmark in der Auffangflüssigkeit schwimmt, schwebt oder sedimentiert (Spalte F).

Bei der Messung Nr. 1 wurde das Knochenmark durch Beckenkamm-punktion entnommen. Bei den Messungen Nr. 11a und 12a handelt es sich um gleichzeitig mit Nr. 11 bzw. mit Nr. 12 durchgeführte Messungen mit unterschiedlichen Mengen des gleichen Knochenmarks. Bei der Messung Nr. 11a verwendeten wir, wie schon auf S. 16 erwähnt, außerdem eine schwächere Konzentration der Trypsinlösung als sonst bei der Standardmethode. - Gleichzeitig mit der Messung Nr. 26 wurde unter Nr. 26a mit dem gleichen Knochenmark ein Meßversuch mit der Serummethode (S. 11) durchgeführt. Bei den Messungen Nr. 27 und 28 schwamm jeweils ein Teil der Knochenmarkbröckel in der Auffangflüssigkeit, der andere Teil sedimentierte. Bei beiden Knochenmarkaspiraten haben wir die absolute Zellzahl der beiden Fraktionen des Knochenmarks getrennt bestimmt und unter Nr. 27/1 bzw. 28/1 die Zellzahl der schwimmenden Knochenmarkbröckel, unter Nr. 27/2 bzw. 28/2 die der sedimentierten angegeben. Bei den Messungen Nr. 33 sowie Nr. 39 bis 43 schwamm ebenfalls ein Teil der Knochenmarkbröckel in der Auffangflüssigkeit, während der andere - die geschätzte Menge der Fraktionen ist in Spalte F in Klammern angegeben - sedimentiert war. Bei diesen Messungen jedoch wurde zur Zellzahlbestimmung schwimmendes und sedimentiertes Mark zusammengekommen (vgl. dazu Abschnitt VI. B.). Das Sternalpunktat der Messung Nr. 39 wurde nach der Entnahme in ein Kühl-fach gebracht und bis zur Feststellung der absoluten Zellzahl 3 Tage lang bei -8°C aufbewahrt.

Die bei unserem Patientengut im Sternalmark gemessenen Werte reichen von $0,41 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ Knochenmark bei einer hyperchromen Anämie (Messung Nr. 2) bis $2,13 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ Knochenmark bei einer Polyzythämia vera (Messung Nr. 38). Mit dem in Abschnitt VI. B. erläuterten Vorbehalt gegenüber den Messungen Nr. 30 - 43 stellen

wir der Messung Nr. 26 die Messung Nr. 37 gegenüber, die 2 Monate vorher zu Beginn der klinischen Therapie bei der gleichen Patientin vorgenommen wurde. -

Weiterhin haben wir mit der Trypsinstandardmethode die absolute Zellzahl im KM vergleichend bestimmt beim gesunden Menschen, beim Hund und bei der Ratte (Tab. IV).

Unsere Meßergebnisse sind von BOLL ausgewertet worden.

VI. Diskussion der Ergebnisse

A. Zusammenhang von spezifischem Gewicht der Knochenmarkbröckel und absoluter Zellzahl

Bei der Vorbereitung des Knochenmarks zur Volumenbestimmung stellten wir fest, daß die Knochenmarkbröckel in der Mischung aus 8 ml physiologischer Kochsalzlösung und 2 ml 3,8 %iger Natriumzitratlösung (spezif. Gewicht der Mischung: $1,010 \text{ g/cm}^3$), in die das Sternalpunktat nach der Aspiration gebracht wurde, entweder an der Oberfläche schwammen, in der Flüssigkeit schwebten oder aber sedimentierten. Bei den schwimmenden Knochenmarkbröckeln wurden Zellzahlen gemessen, die unter $0,69 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ Knochenmark lagen, bei dem sedimentierten Knochenmark Zellzahlen von $0,94 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ Knochenmark und darüber. Knochenmarkbröckel mit Zellzahlen, die zwischen diesen Werten lagen, u. a. die Normalfälle Nr. 44 und 45, schwebten in der Flüssigkeit oder gingen sehr langsam zur Oberfläche (Tab. III Spalte F und G, Tab. IV Spalte E und F).

Dies gilt mit einer Ausnahme für alle 32 verlässlichen Messungen von menschlichem Knochenmark (Nr. 1 - 26, 27/1, 27/2, 28/1, 28/2, 44 und 45 - zur kritischen Wertung der anderen Messungen siehe Abschnitt VI. B.). Die eine Abweichung von diesen Beobachtungen (Messung Nr. 17) läßt sich dadurch erklären, daß ungleiche Mengen Blut mit in die Auffangflüssigkeit gelangten und deren spezif. Gewicht ver-

A Lfd. Nr.	B Name, Geschlecht, Alter	C Markort	D Menge KM in mm ³	E KM schwimmt (1), schwebt (2), sedi- mentiert (3) in der Auffangflüssigkeit	F Zellzahl ($\cdot 10^6$ / mm ³ KM)	G Normalwerte ande- rer Autoren
MENSCH						
44	H. M. ♂ 36 J. klinisch gesund, Blutbild normal	Sternum	2,8	2	0,86	BAUMGARTEN u. BOROVICZÉNY (S. 59) $0,6 - 0,8 \cdot 10^6$ /mg KM
45	L. S. ♂ 31 J. klinisch gesund, Blutbild normal	Sternum	2,0	2	0,69	SANDKÜHLER $0,45 \cdot 10^6$ /cm ² Ausstr. 1 cm ² Ausstr. ent- spricht etwa 1 mm ³ KM
MITTELWERT					0,78 =====	
HUND						
46	Schäferhund Bastard "Dago" ♂ 6 J. 25,6 kg klinisch gesund, Blutbild normal	Sternum	0,7	3	1,17	PATT $1,010 \cdot 10^6$ / mm ³ KM FAIRMAN (zit. n. PATT $1,13 \cdot 10^6$ /mm ³ KM REKERS $1,0 \cdot 10^6$ / mm ³ KM
47	- " - 3 1/2 Monate später	Sternum	0,2	3	1,50	
MITTELWERT					1,34 =====	
48	"Dago" Parallelmes- sung neben Nr. 47	Rippe	1,0	1	0,40	
49	Schäferhund-Schnau- zer-Bastard ♂ 6 J. 35 kg klinisch gesund, Blutbild normal	Rippe	4,0	1	0,63	
MITTELWERT					0,52 =====	
RATTE						
50	Ratte 1 WISTAR A6/Han. ♂ 12 Wo. alt	Femur u. Humerus	0,7	3	3,50	HULSE (S. 53) $2,35 - 2,59 \cdot 10^6$ / mm ³ KM
51	Ratte 2 - " -	- " -	3,0	3	3,14	
MITTELWERT					3,32 =====	

Tab. IV. Vergleichende Bestimmung der absoluten Zellzahl im KM
von Mensch, Hund und Ratte. Trypsinstandardmethode.
(KM = Knochenmark)

änderten. Man kann dies ausschließen, wenn man die Knochenmarkbröckel auf dem Perlonsieb durch Übergießen mit physiologischer Kochsalzlösung von Blut reinigt und erst dann der Schwimmprobe unterzieht. Wir haben das in Anbetracht der relativ geringen Abweichung (3 %) von der Regel unserer Beobachtungen nicht getan und können daher nicht beurteilen, ob durch diese weitere Behandlung das Knochenmark geschädigt wird.

Schwimmendes, also zellarmes Knochenmark muß nicht pathologisch sein. Es kann sich dabei um altersbedingt zellarmes, normales Mark handeln, wie bei den Messungen Nr. 3, 6, 7 und 9. Nach ROHR (S. 17) darf bei markarmen Strukturen nur bei wiederholt gleichem Ergebnis an verschiedenen Stellen eine Hypofunktion diagnostiziert werden, dagegen sind hyperplastische Strukturen stets als solche im positiven Sinn zu werten. Da es auch für die zytologische Beurteilung der Knochenmarkausstriche von Vorteil ist, wenn die Knochenmarkbröckel aus dem Sternalpunktat vor dem Ausstreichen in der in Abschnitt IV. angegebenen Weise gewaschen werden, hat die Suche nach Knochenmarkbröckeln, die in der Auffangflüssigkeit sedimentiert sind, den Wert einer einfachen diagnostischen Schnellmethode.

B. Beobachtungen und Messungen von Knochenmark mit inhomogener Zelldichte

Bei dem Knochenmark von 9 Sternalpunktionen (Versuch Nr. 7, Messungen Nr. 27, 28, 33, 39 - 43) beobachteten wir, daß ein Teil der Knochenmarkbröckel in der Auffangflüssigkeit sedimentierte, während der andere an der Oberfläche schwamm. Zweimal konnte die absolute Zellzahl vom schwimmenden wie vom sedimentierten Knochenmark jeweils getrennt bestimmt werden (Messungen Nr. 27/1 und 27/2, sowie Nr. 28/1 und 28/2). Dabei verhielten sich die absoluten Zellzahlen zueinander wie etwa 1:2. Wir sind damit den Beobachtungen von BAUMGARTEN und BOROVICZÉNY (S. 60) sowie anderer Autoren weiter nachgegangen. Bei postmortalen Markausstrichen, die mittels Sternalpunktion gewonnen wurden, fand HELPAP (zit. n. ROHR S. 17) etwa in einem Viertel der Fälle makroskopisch inhomogenes Mark mit erheblich schwankendem Zellgehalt. REITER (zit. n. ROHR S. 17) fand in zwei Drittel seiner

Knochenmarkuntersuchungen kleinere Fettherde im aktiven roten Mark.

Bei der Differenzierung der Ausstrichpräparate, die wir von schwimmenden wie von sedimentierten Knochenmarkbröckeln jeweils getrennt angefertigt haben, ergab sich eine Übereinstimmung des Myelogramms der zellarmen wie der zellreichen Knochenmarkbröckel beim gleichen Patienten. Diese Beobachtungen werden durch Untersuchungen von STASNEY und HIGGINS (zit. n. ROHR S. 17) bestätigt. -

Die Beobachtung, daß die Zelldichte im menschlichen Knochenmark nicht homogen zu sein braucht, hat Konsequenzen für die Bestimmung der absoluten Zellzahl. Wenn nämlich die Zellzahl von Knochenmark, bei dem ein Teil der Bröckel in der Auffangflüssigkeit schwimmt und der andere sedimentiert, nicht bei beiden Fraktionen getrennt bestimmt wird, dann ist es möglich, daß sedimentiertes und schwimmendes Knochenmark nicht in dem gleichen Verhältnis in das Meßröhrchen gebracht wird, in dem es sich im gesamten Sternalmark befindet. Dadurch werden weder die Grenzwerte der zellreichen und der zellarmen Markbröckel noch die genaue durchschnittliche Zelldichte im Sternalmark erfaßt. Daher müssen die Ergebnisse der Messungen Nr. 39 - 43, bei denen wir schwimmendes und sedimentiertes Mark zusammenbestimmt haben, kritisch gewertet werden. - Aber auch bei Knochenmark, das sich bei der Schwimmprobe einheitlich verhält, muß das Meßergebnis nicht in jedem Fall der genauen durchschnittlichen Zelldichte entsprechen, wenn - wie bei den Messungen Nr. 30 - 38 - für die Bestimmung der absoluten Zellzahl zu wenig Knochenmarkmaterial zur Verfügung stand. Es sind sicher auch geringere Zellzahlunterschiede innerhalb eines Sternalpunktates anzunehmen, die durch die Schwimmprobe nicht erfaßt werden. Daher müssen nach unseren nachstehend beschriebenen Beobachtungen für die Messung der absoluten Zellzahl bei Knochenmarkbröckeln, die sich bei der Schwimmprobe einheitlich verhalten, mindestens 2 mm³ Knochenmark zur Verfügung stehen, damit das Ergebnis der wirklichen durchschnittlichen Zelldichte entspricht. Wir setzen 2 mm³ Knochenmark deswegen als

Mindestmenge fest, weil wir bei 2 parallellaufenden Messungen von $4,0 \text{ mm}^3$ und $2,0 \text{ mm}^3$ des gleichen Knochenmarks (Messung Nr. 11 und 11a) ein annähernd gleiches Ergebnis erhalten haben, während bei 2 anderen ebenso parallellaufenden Messungen von $6,0 \text{ mm}^3$ und $1,48 \text{ mm}^3$ Knochenmark (Messung Nr. 12 und 12a) ein beträchtlicher Zellzahlunterschied festgestellt wurde. Die Volumenbestimmung von $1,48 \text{ mm}^3$ Knochenmark wurde dabei mit einer Pipette vorgenommen, die ein engeres Lumen besitzt als die Pipettenstücke, die wir sonst benutzen.

Aus den genannten Gründen halten wir die Verlässlichkeit der Messungen Nr. 30 - 43 nicht für gewährleistet. - Da nach unseren Beobachtungen das Knochenmark vom Hund und von der Ratte bezüglich der Zelldichte weitgehend homogen ist, erhält man bei diesen Spezies verlässliche Messungen auch mit sehr kleinen Mengen Knochenmark.

C. Unterschiedliche Zelldichte im Knochenmark verschiedener Knochen des gleichen Individuums

Bei Schäferhundbastarden stellten wir anhand von gleichzeitig durchgeführten Messungen fest, daß das Knochenmark in der Rippe eine wesentlich geringere Zelldichte aufweist als das Knochenmark im Sternum (vgl. dazu Tab. IV, Messungen Nr. 46 - 49). Wir können insoweit die Beobachtungen CUSTERS (zit. n. ROHR S. 30) bestätigen, nach denen das Knochenmark der Wirbel den reichsten, das Knochenmark des Sternums einen etwas geringeren und das Knochenmark der Rippen den geringsten Zellgehalt aufweisen.

In diesem Zusammenhang ist auch die niedrige Zellzahl einer Punktion des menschlichen Beckenkammes (Tab. III Messung Nr. 1) zu vergleichen mit dem Mittelwert von 2 normalen menschlichen Sternalpunktaten (Tab. IV Messungen Nr. 44 und 45).

D. Vergleich der durch die angegebene Trypsinstandardmethode ermittelten absoluten Zellzahlen mit den Ergebnissen der routinemäßigen Beurteilung der Zelldichte im Ausstrich (Hämatologisches Labor der I. Inneren Abt. des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln)

Bei insgesamt 23 Sternalpunktaten (Messungen Nr. 2 - 26, davon wurden Nr. 10 und 13 nicht beurteilt), stimmte die Beurteilung der Zelldichte in den mit gleichmäßiger Technik angefertigten Ausstrichen mit der absoluten Zellzahl

in 8 Fällen überein.

In 4 Fällen bestand ein geringfügiger,

in 6 Fällen ein beträchtlicher und

in 5 Fällen ein großer Unterschied.

Da sich die Knochenmarkbröckel dieser Sternalpunktate bei der Schwimmprobe jeweils einheitlich verhielten, kann man die hier festgestellten Diskrepanzen nicht durch unterschiedliche Zelldichte innerhalb eines Sternalpunktates erklären. Man wird vielmehr die Gründe in dem schon von SANDKÜHLER hervorgehobenen subjektiven Moment des Beurteilens, aber auch in der recht unterschiedlichen Festigkeit der Knochenmarkinterzellulärsubstanz, durch die die Dichte der Ausstriche mitbestimmt wird, sehen müssen. Da die zuletzt genannte Fehlerquelle auch durch die von SANDKÜHLER angegebene Methode (siehe Abschn. I.) nicht auszuschließen ist, bleibt die Bestimmung der absoluten Zellzahl bzw. der Zelldichte von Knochenmark im Ausstrich mit einer großen Fehlerbreite behaftet.

VII. Zusammenfassung

In Anlehnung an DULBECCO und YOUNGNER wurde eine Methode zur Bestimmung der absoluten Zellzahl von Knochenmarkaspiraten entwickelt. Es ergaben sich für den Normalfall im Mittel: $0,78 \cdot 10^6$ kernhaltige Zellen pro mm^3 Knochenmark aus dem menschlichen Sternum.

Eine Übereinstimmung der mit der beschriebenen Methode gefundenen Werte mit den Schätzungen der Zelldichte in den Ausstrichpräparaten wurde nur in ca. 30 % der verglichenen Messungen festgestellt. Statt der Schätzung der Zelldichte in den Ausstrichpräparaten wird eine leicht durchführbare Beurteilung erhöhten oder erniedrigten Zellgehaltes im Knochenmark empfohlen.

VII. Literaturverzeichnis

- BAUMGARTEN E. und v. BOROVICZÉNY K. G. : Bestimmung der absoluten Zellzahl im Knochenmarkbröckel. *Folia haematologica*, Neue Folge, 7, S. 56 - 63 (1963)
- BOLL I. T. M. : Some proofs for the existence of sleeping cells in human granulocytopoiesis. *Haematol. Latina* X, 49 - 54 (1967)
- DULBECCO R. : Monolayer tissue cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 747 (1952)
- ENDICOTT K. M. : Plasma or serum as a diluting fluid for thin smears of bone marrow. *Stain Technol.* 20:25 (1945)
- FELDSTEIN S. : A method of studying the effect of serum on tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 12, 187 - 191 (1929)
- GRUNKE W. : *Lehrbuch der Hämatologie*. VEB Gustav Fischer Jena 2. Aufl. (1966)
- HULSE E. V. : Quantitative cell counts of the bone marrow and blood and their secular variations in the normal adult rat. *Acta haemat.* 31, 50 - 63 (1964)
- LEUTHARDT F. : *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*. de Gruyter, Berlin 15. Aufl. 1963
- PATT H. M. : A consideration of myeloid-erythroid balance in man. *Blood*, 12, 777 - 787 (1957)
- REKERS P. E. und COULTER M. : A haematological and histological study of the bone marrow and peripheral blood of the adult dog. *Amer. J. med. sci.*, 216, 643 (1948)
- ŘEŘÁBEK J. und ŘEŘÁBEK E. : *Leitfaden der Gewebezüchtung*. VEB Gustav Fischer Jena 1960
- ROHR K. : *Das menschliche Knochenmark*. Thieme, Stuttgart, 1960. 3. Aufl.
- SANDKÜHLER S. (1): Über quantitative Untersuchung von Knochenmarkausstrichen. *Schweiz. Med. W. schr.* 85, 943 (1955)
- SANDKÜHLER S. (2): Über Sinn und Vorteil quantitativer Knochenmarksbeurteilung. *Leitz Mitt. Wiss. Techn.* 1, 90 - 91 (1959)

- SANDKÜHLER S. und GROSS E. : Normal bone marrow. Total cell and differential values by quantitative analysis of particle smears. *Blood* 11, 856 - 862 (1956)
- WEICKER H. : Morphologie und Kinetik der normalen und pathologischen Erythropoese. *Folia haemat. Neue Folge* 9, 153 - 196 (1964)
- YOFFEY J. M. : Bone marrow. *Brit. Med. J.* II:193 - 197 (1954)
- YOUNGNER J. S. : Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.* 85, 202 (1954)
- YOUNGNER J. S. : Monolayer tissue cultures. II. Poliomyelitis virus assay in roller tube cultures of trypsin-dispersed monkey kidney. *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.* 85, 527 (1954)

Frau Privatdozentin Dr. med. Boll danke ich für die Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit auf dem Gebiet der Hämatologie und insbesondere für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Zu danken habe ich auch Herrn Dr. med. vet. Saar, Wiss. Oberassistent an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, für seine Hilfsbereitschaft bei der Gewinnung der Knochenmarkproben von 2 Hunden und für die Gastfreundschaft im Labor der gen. Klinik bei den Bestimmungen der absoluten Zellzahl dieses Knochenmarks.

Lebenslauf

Ich, Alwin Dieter Claus, wurde am 13. 11. 1933 in Pirna als Sohn des Fleischermeisters Alwin Cl. und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Seidler, geboren.

Von 1940 bis 1944 besuchte ich die Volksschule in Meißen, danach bis zum Abitur 1952 die Kreuzschule zu Dresden. Von 1952 bis 1957 studierte ich in Leipzig und an der Humboldt-Universität Berlin Theologie. 1957 bestand ich das I., 1959 das II. Theologische Examen. Am 3. 6. 1962 wurde ich ordiniert. Von der Evangelischen Kirche Berlin-Brandenburg wurde ich von 1958 bis 1967 vorwiegend mit seelsorgerlichem Dienst an psychiatrisch und neurologisch Kranken beauftragt. Von 1957 bis 1962 war ich Hörer und Lehranalysand am Berliner Psychoanalytischen Institut.

Von 1960 bis 1967 studierte ich an der Freien Universität Berlin Medizin. Im September 1967 bestand ich in Berlin die ärztliche Prüfung.

Seit November 1967 arbeite ich als Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Neustadt/Holst.

Nach Erhalt der ärztlichen Approbation habe ich die Absicht, sowohl ärztlich als auch kirchlich-seelsorgerlich zu arbeiten.

